

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局



(43) 国際公開日
2005 年 7 月 14 日 (14.07.2005)

PCT

(10) 国際公開番号
WO 2005/063967 A1

(51) 国際特許分類: C12N 5/06, A61L 27/00, C12Q 1/02

(74) 代理人: 平木 祐輔, 外 (HIRAKI, Yusuke et al.); 〒1050001 東京都港区虎ノ門 4 丁目 3 番 20 号 神谷町 MT ビル 19 階 Tokyo (JP).

(21) 国際出願番号: PCT/JP2004/019666

(22) 国際出願日: 2004 年 12 月 21 日 (21.12.2004)

(81) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の国内保護が可能): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NA, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.

(25) 国際出願の言語: 日本語

(26) 国際公開の言語: 日本語

(30) 優先権データ:
特願 2003-429088
2003 年 12 月 25 日 (25.12.2003) JP

(71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): 有限会社金沢大学ティ・エル・オー (KANAZAWA UNIVERSITY TECHNOLOGY LICENSING ORGANIZATION LTD.) [JP/JP]; 〒9201192 石川県金沢市角間町又 7 番地 金沢大学内 Ishikawa (JP). 独立行政法人科学技術振興機構 (JAPAN SCIENCE AND TECHNOLOGY AGENCY) [JP/JP]; 〒3320012 埼玉県川口市本町 4 丁目 1 番 8 号 Saitama (JP).

(84) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の広域保護が可能): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), ヨーロッパ (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, MC, NL, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

(72) 発明者; および

添付公開書類:
— 国際調査報告書

(75) 発明者/出願人 (米国についてのみ): 高倉 伸幸 (TAKAKURA, Nobuyuki) [JP/JP]; 〒9218117 石川県金沢市緑が丘 3-27 ダイアパレス緑が丘 108 号 Ishikawa (JP). 山田 賢裕 (YAMADA, Takahiro) [JP/JP]; 〒9200901 石川県金沢市彦三 1-9-5-405 Ishikawa (JP).

2 文字コード及び他の略語については、定期発行される各 PCT ガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語のガイダンスノート」を参照。

(54) Title: INDUCTION OF MYOCARDIAL CELL WITH THE USE OF MAMMALIAN BONE MARROW CELL OR CORD BLOOD-ORIGIN CELL AND FAT TISSUE

(54) 発明の名称: 哺乳動物の骨髄細胞または臍帯血由来細胞と脂肪組織を利用した心筋細胞の誘導

(57) Abstract: It is intended to provide a technique of inducing the differentiation of mammalian bone marrow cells or cord blood-origin cells into myocardial cell precursors and/or myocardial cells by culturing the mammalian bone marrow cells or cord blood-origin cells together with cells isolated from a mammalian fat tissue or a culture supernatant thereof.

(57) 要約: 本発明は、哺乳動物の骨髄細胞または臍帯血由来細胞を、哺乳動物の脂肪組織から単離された細胞またはその培養上清とともに培養することにより、該骨髄細胞または臍帯血由来細胞を心筋前駆細胞および/または心筋細胞に分化誘導する技術を提供する。



WO 2005/063967 A1

明 細 書

哺乳動物の骨髄細胞または臍帯血由来細胞と脂肪組織を利用した
心筋細胞の誘導

5

技 術 分 野

本発明は、哺乳動物の骨髄細胞または臍帯血由来細胞と脂肪組織を利用した心筋細胞の分化誘導技術に関する。

10 背 景 技 術

心筋細胞は成体になるとその増殖を停止するため、一度心筋梗塞に陥った心臓領域では心筋細胞の回復は望めず、心臓は再生不可能な組織と考えられてきた。しかし、近年心臓内に心筋細胞の前駆／幹細胞が存在し、その分裂や心筋細胞への分化も一部では認められることがわかってきた

15 (Beltrami A. P., et al., “Adult Cardiac Stem Cells Are Multipotent and Support Myocardial Regeneration”, Cell, Vol. 114, p763-776, 2003)。また、心筋細胞に分化可能な異所性の細胞を心筋細胞に分化誘導する技術が開発されれば、これまで困難とされてきた心筋梗塞の治療が可能になる。

胎児期の万能細胞である胚性幹細胞（ES 細胞）は、容易に心筋細胞に分化可能である。しかしながら、各患者の ES 細胞を作製することは倫理的に問題があり、また無差別に作製された ES 細胞から分化した心筋細胞は免疫拒絶を生じるため、実際の医療に使用することはできない。

骨髄間質には多分化能を有する間葉系幹細胞が存在し、この間葉系幹細胞を用いた組織再生については、従来より多くの報告がなされてきた。例えば、骨髄由来の筋細胞を利用した骨格筋再生 (Ferrari G. et al., “Muscle regeneration by bone marrow-derived myogenic progenitors.” Science. 1998, 279 (5356) :p1528-30.)、心臓への c-kit 陽性骨髄幹細胞投与による心機能改善 (Orlic D, et al., “Bone marrow cells regenerate infarcted myocardium”, Nature Vol. 410 No. 5 2001 p701-705)、骨髄由来細胞による心筋再生 (特表 2 0 0 2 - 5 1 1 0 9 4 号公報、W O 0 1 /

048151号、特表2002-521493号公報)等が知られている。
この間葉系幹細胞に脱メチル化酵素を添加して、一度細胞をリセットすることにより、心筋細胞への分化が可能になることも報告されている(Makino S. et al., “Cardiomyocytes can be generated from marrow stromal cells
5 in vitro”, The Journal of Clinical Investigation 103:p697-705 (1999))。しかし、この方法で作製された心筋細胞は、脱メチル化という処理が施されているため、将来的に奇形発生の恐れがあるなど、臨床応用にはハードルが高い。

一方で、間葉系幹細胞を用いた組織再生には、使用される骨髄の量的限界の問題があり、組織再生の材料としてより豊富なソースが望まれている。
10 脂肪組織は入手容易な組織であるが、最近、ヒト脂肪組織から多分化能を有する細胞が単離され、神経細胞への分化が確認された(Zuk P. A. et al., “Multilineage Cells from Human Adipose Tissue: Implications for Cell-Based Therapies”, Tissue Engineering, Vol.7, No.2, 2001,
15 p211-228;Zuk P. A. et al., “Human Adipose Tissue Is a Source of Multipotent Stem Cells” Molecular Biology of the Cell, Vol.13, p4279-4295, 2002)。また、マウスで心筋細胞に分化可能な筋芽細胞由来細胞株も単離されている(特開2003-325169号公報、特開2003-259863号公報)。しかしながら、特殊な細胞株であったり、分化
20 誘導に複雑な培養工程を必要とするなど、いずれも現実的とはいえない。

発明の開示

本発明の課題は、in vitro で簡便に心筋細胞を分化誘導する技術を提供することにある。

25 発明者らは、脂肪組織中の間葉系細胞を通常の牛血清を含む培養液中で心筋細胞に分化誘導できることを見出した。さらに、骨髄細胞または臍帯血由来細胞を、哺乳動物の脂肪組織から単離された細胞またはその培養上清とともに培養することにより心筋細胞に分化誘導できることを見出した。

本発明は、哺乳動物の骨髄細胞または臍帯血由来細胞を、哺乳動物の脂肪組織から単離された細胞またはその培養上清とともに培養することによ
30

り、該骨髓細胞または臍帯血由来細胞を心筋前駆細胞および／または心筋細胞に分化させる方法を提供する。

前記方法において、培養液中には、牛血清のほか、分化増殖を促すサイトカインが含まれることが好ましい。そのようなサイトカインとしては、
5 例えば、EGF、TGF- α 、HB-EGF、FGF、HGF 等の EGF ファミリー、TGF- β 等の TGF- β ファミリー、LIF 等の IL ファミリー、VEGF-A 等の VEGF ファミリー、PDGF-AB、PDGF-BB 等の PDGF ファミリー、エフリン B 等のエフリンファミリー、SCF (Stem cell factor) などを挙げることができる。

細胞の培養期間は特に限定されないが、少なくとも 1 日間は培養すること
10 とが好ましい。

本発明で用いられる骨髓細胞としては、骨髓間質細胞、特に間葉系幹細胞、あるいは造血幹細胞分画の細胞が好ましい。また、臍帯血由来細胞としては、臍帯血中の単核球が好ましい。

共培養する骨髓細胞または臍帯血由来細胞と脂肪組織から単離された細胞との混合比率は特に限定されないが、0.1 : 1 ~ 1 : 10 程度が好ましい。特に骨髓細胞の場合であれば、脂肪組織から単離された細胞に対して約 1 : 4 程度が好適である。
15

さらに本発明は、上記のいずれかの方法で作製される心筋前駆細胞および／または心筋細胞を提供する。これらの心筋前駆細胞および／または心筋細胞は、材料となる脂肪組織や骨髓細胞として、移植すべき哺乳動物由来のものを
20 用いれば、移植後の拒絶反応の危険性を抑えることができる。

本発明はまた、心筋前駆細胞および／または心筋細胞に被験物質を添加することにより、心筋前駆細胞および／または心筋細胞に対する該被験物質の効果を評価する方法を提供する。この方法は、心筋細胞の薬剤感受性
25 試験や心疾患治療薬のスクリーニングに利用することができる。

本発明によれば、哺乳動物の骨髓細胞または臍帯血由来細胞と脂肪組織から簡便に心筋細胞を得ることができる。得られる心筋細胞は、遺伝子操作を施していないため安全性が高く、心筋細胞に特徴的な遺伝子発現や表現形質を呈する。したがって、本発明で得られる心筋前駆細胞および心筋
30 細胞は、心再生や心筋細胞に作用する薬剤の評価に利用することができる。

現在、心筋梗塞に対する虚血領域への血管再生医療は大量の骨髓液から得られた血管幹細胞の局所への移植により行なわれている。骨髓液採取は、全身麻酔下で行なわれ、高齢者においては、その手技自体にリスクがかかる行為である。脂肪組織の採取は皮膚の単純な局所麻酔で可能であり、生命を脅かすリスクは極めて稀である。したがって、本発明は医療業界に多大な貢献をもたらす。

図面の簡単な説明

図 1 は、脂肪組織の培養結果（心筋細胞への分化）を示す（A：培養開始時、B：培養 7 日後、C：培養 14 日後、D：培養 28 日後）。

図 2 は、培養 14 日後の脂肪組織の免疫染色結果を示す（A:anti-sarcomeric actin (SA) 抗体、B:anti-cardiac actin 抗体）。

図 3 は、フローサイトメトリーでの分画（左）と、分画回収した Lin 陰性 $\beta 1$ インテグリン陽性細胞を試験管内で培養し、抗 SA 抗体で免疫染色した結果（右）を示す。

図 4 は、脂肪組織から分化した細胞の遺伝子発現解析（RT-PCR）の結果を示す。

図 5 は、脂肪組織から分化した細胞の核内転写遺伝子解析（RT-PCR）の結果を示す。

図 6 は、脂肪組織由来の細胞と骨髓細胞との共培養結果を示す（A:脂肪組織由来細胞と骨髓細胞との共培養結果、B:骨髓細胞の単独培養結果）。

図 7 は、脂肪組織由来の細胞に対して、共培養する骨髓由来の細胞数（横軸：cells）を変化させたときの、得られる心筋細胞コロニー数（縦軸：colony/well）の変化を示すグラフである。棒グラフ上部は、骨髓由来細胞から得られた心筋細胞コロニー数、下部は心筋組織から得られた心筋細胞コロニー数を示す。

図 8 は、ヒト脂肪組織からの心筋細胞の分化誘導結果を示す。A：抗 SA 抗体による免疫染色の結果（上：矢印は心筋細胞を示す。下：ネガティブコントロール）、B：全接着細胞数に対する SA 陽性細胞数率%（右：PDGF-AB 添加、左：PDGF-AB 非添加）

- 図 9 は、ヒト臍帯血中単核球 (hCBMNC) からの心筋細胞の分化誘導結果を示す。A : hCBMNC (下) とマウス脂肪組織 (上) をCell culture insert (矢印) で隔てた共培養方法、B : 抗SA抗体を用いた免疫染色結果 (右 : 共培養、左 : hCBMNCのみ培養)、C : 全接着細胞数に対するSA陽性細胞数率% (右 : 共
- 5 培養、左 : hCBMNCのみ培養)

本明細書は、本願の優先権の基礎である特願 2 0 0 3 - 4 2 9 0 8 8 号の明細書に記載された内容を包含する。

10 発明を実施するための最良の形態

1. 脂肪組織から単離された細胞を心筋細胞に分化させる方法

脂肪組織中の間葉系細胞を通常の牛血清を含む培養液中で心筋細胞に分化誘導することができる。

1. 1 脂肪組織から単離された細胞

- 15 本発明の方法で用いられる脂肪組織は、哺乳動物由来のものであれば特に限定されない。すなわち、哺乳動物の胎児、新生児、成体の任意の部位の脂肪組織を使用することができる。細胞は、例えば実体顕微鏡下で、正確に脂肪組織のみを回収し、機械的処理および／またはコラゲナーゼ処理やディスパーゼ処理等の酵素処理を施すことにより、個々の単一の細胞と
- 20 して単離することができる。

こうして脂肪組織から単離された細胞中には、脂肪細胞、脂肪前駆細胞、体性幹細胞等も含まれるが、本発明で用いられる脂肪組織由来の細胞には、そのような細胞が含まれていてもよい。これらの細胞は、Lin 陰性、c-Kit 陰性～弱陽性、および $\beta 1$ インテグリン陽性であることが確認されている。

25 1. 2 培養条件

- 単離された細胞の培養液としては、DMEM 培養液、MEM 培養液、 α -MEM 培養液、RPMI 培養液、DMEM/F12 培養液等、通常哺乳動物の脂肪細胞の培養に用いられる培養液に適量の牛血清を添加したものを使用する。添加される牛血清の量は、特に限定されず、細胞の起源や種類に応じて適宜設定され
- 30 る。好ましくは 0%～20%、より好ましくは 5%～10% 程度の牛血清を添加

するとよい。牛血清に代えて、ニュートリドーマ (Behringer 製)、ヒト血清等を使用してもよい。

培養は、市販の培養皿上を用いて 2 次元的に行う。温度や CO_2 等の条件は、用いる細胞の性質に応じて適宜設定されるが、一般に 4~6% CO_2 、33
5 ~37℃、特に 5% CO_2 、37℃ 程度で行われる。細胞の培養期間も特に限定されず、必要とされる心筋細胞の発現が認められるまで、適宜培地交換を行いながら培養を行えばよい。発明者らの実験結果では、培養開始から 3 日後より、ピーティングする心筋細胞が発現し、同時に球形の心筋前駆細胞 (心筋幹細胞) の増殖が開始した。

10 培養に際しては、細胞の分化増殖を促すサイトカインを適宜培養液に添加してもよい。そのようなサイトカインとしては、例えば、EGF、TGF- α 、HB-EGF、FGF、HGF 等の EGF ファミリー、TGF- β 等の TGF- β ファミリー、LIF 等の IL ファミリー、VEGF-A 等の VEGF ファミリー、PDGF-AB、PDGF-BB 等の PDGF ファミリー、エフリン B 等のエフリンファミリー、SCF (Stem cell
15 factor) などを挙げることができる。特に、LIF、HB-EGF、PDGF が好ましい。

添加されるサイトカインの量は、用いるサイトカインや細胞の性質に応じて適宜設定される。マウスの脂肪組織から単離された細胞を用いた場合、LIF であれば 1000u/ml~5000u/ml 程度、HB-EGF であれば 100ng/ml~1 μ
20 g/ml 程度添加するとよいが、これに限定されるものではない。

2. 骨髓細胞または臍帯血由来細胞の心筋細胞への分化誘導

骨髓細胞または臍帯血由来細胞に、哺乳動物の脂肪組織から単離された細胞またはその培養上清を添加して、牛血清を含む培養液中で培養することにより、該骨髓細胞または臍帯血由来細胞を心筋前駆細胞および／または心筋細胞に分化させることができる。

2. 1 脂肪組織から単離された細胞またはその培養上清

前記方法において、脂肪組織からの細胞の単離は、前項 1 にしたがって行えばよい。培養上清としては、単離された脂肪組織由来細胞を前項 1 と
30 同様の条件で適当期間培養して得られる培養物の上清を用いることができ

る。培養期間は特に限定されないが、少なくとも 1 日以上培養した培養物の上清を用いることが好ましい。

2. 2 骨髓細胞

前記方法で用いられる骨髓細胞は、哺乳動物由来のものであれば特に限定されない。すなわち、哺乳動物の胎児、新生児、成体の骨髓由来の任意の細胞を用いることができるが、骨髓間質細胞、特に間葉系幹細胞、あるいは造血幹細胞分画の細胞が好ましい。これら骨髓細胞の哺乳動物からの採取は、周知の方法にしたがって行われる。骨髓細胞としては初代培養細胞を用いることが好ましいが、凍結保存されている骨髓細胞を用いてもよい。

前記骨髓細胞と脂肪組織は同じ種に由来するものであることが好ましい。つまり、マウス骨髓細胞にはマウス脂肪組織由来の細胞を使用し、ラット骨髓細胞にはラット脂肪組織由来の細胞を使用することが好ましい。

2. 3 臍帯血由来細胞

前記方法で用いられる臍帯血由来細胞は、哺乳動物由来のものであれば特に限定されないが、臍帯血中の単核球が好ましい。臍帯血からの細胞の採取は、周知の方法にしたがって行われる。また前項同様、臍帯血由来細胞と脂肪組織は同じ種に由来するものであることが好ましい。

2. 4 培養条件

細胞の培養液としては、DMEM 培養液、MEM 培養液、 α -MEM 培養液、RPMI 培養液、DMEM/F12 培養液等、通常哺乳動物の細胞培養に用いられる培養液に適量の牛血清を添加したものを使用する。添加される牛血清の量は、特に限定されず、細胞の起源や種類に応じて適宜設定される。好ましくは 0% ~ 20%、より好ましくは 5% ~ 10% 程度の牛血清を添加する。牛血清に代えて、ニュートリドマ (Behringer 製)、ヒト血清等を使用してもよい。

培養は、脂肪組織から単離された細胞を骨髓細胞または臍帯血由来細胞に添加して、市販の培養皿上で 2 次元的に共培養するか、あるいは両者の液性因子が往来できる環境下で共培養する。骨髓細胞または臍帯血由来細胞と脂肪組織から単離された細胞との混合比は (細胞数比)、0.1 : 1 ~ 1 : 10、特に骨髓細胞の場合であれば 1 : 4 程度が好適である。

脂肪組織由来細胞の培養上清を骨髄細胞または臍帯血由来細胞に添加する場合は、上記したように適当期間、少なくとも1日以上培養した細胞の培養上清を骨髄細胞または臍帯血由来細胞に加えて2次元的に共培養する。添加する培養上清の量は特に限定されず、用いる細胞の種類に応じて適宜調整されるが、マウス骨髄細胞の場合であれば、骨髄細胞に対して1~10倍、好ましくは4倍の数の脂肪組織由来細胞を培養して得られる培養上清を用いることが好ましい。

温度やCO₂等の条件は、用いる細胞の性質に応じて適宜設定されるが、一般に4~6%CO₂、33~37℃、特に5%CO₂、37℃程度で行われる。培養期間も特に限定されず、必要とされる心筋細胞の発現が認められるまで、適宜培地交換を行いながら培養を行えばよい。発明者らの実験結果では、培養開始から7日後より、ビーティングする心筋細胞が発現し、同時に球形の心筋前駆細胞（心筋幹細胞）の増殖が開始した。さらに培養開始後1~2週間の間には20~60コロニーくらいの心筋細胞と思われるコロニーが生成した。

培養に際しては、細胞の分化増殖を促すサイトカインを適宜培養液に添加してもよい。そのようなサイトカインとしては、例えば、EGF、TGF- α 、HB-EGF、FGF、HGF等のEGFファミリー、TGF- β 等のTGF- β ファミリー、LIF等のILファミリー、VEGF-A等のVEGFファミリー、PDGF-AB、PDGF-BB等のPDGFファミリー、エフリンB等のエフリンファミリー、SCF (Stem cell factor)などを挙げることができる。特に、LIF、HB-EGF、PDGFが好ましい。

添加されるサイトカインの量は、用いるサイトカインや細胞の性質に応じて適宜設定される。マウスの脂肪組織から単離された細胞を用いた場合、LIFであれば1000 μ /ml~5000 μ /ml程度、HB-EGFであれば100ng/ml~1 μ g/ml程度、PDGF-ABであれば1ng/ml~50ng/ml程度添加するとよいが、これに限定されるものではない。

3. 脂肪組織、骨髄細胞、臍帯血由来細胞から分化誘導された心筋細胞
本発明は、上記のいずれかの方法で作製される心筋前駆細胞および／ま

たは心筋細胞を提供する。ここで心筋前駆細胞とは、心筋細胞に分化する能力をそなえた細胞であって、心筋幹細胞を包含する。

これらの細胞は、その起源となる細胞とは異なり、心筋細胞に特徴的な形態的特性、タンパク発現、遺伝子発現を示す。例えば、電子顕微鏡下、心筋細胞はミトコンドリアに富み、ANP 顆粒を含有し、Z 帯を有し、倒立顕微鏡下、ビーティングする紡錘形をした細胞で、徐々に集合してシートを形成し、同調してビーティングする細胞として観察される。また、心筋前駆細胞はそれよりも丸い球形の細胞で、徐々に紡錘形となり、ビーティングする細胞として観察される。一方、タンパク発現においては、心筋細胞に特徴的な sarcomeric actin (α -Sarcomeric Muscular Actin (Sr-1)) および cardiac actin の発現がみられ、遺伝子発現では心筋細胞に特徴的な α , β -MHC、MLC-2v、BNP の発現や、転写因子 GATA-4 や NKX2.5 の発現がみられる。これらの特徴から、分化誘導された細胞は心筋細胞または心筋前駆細胞であることが確認できる。

15

4. 脂肪組織、骨髄細胞、臍帯血由来細胞から分化誘導された心筋細胞の用途

4. 1 再生医療への応用

本発明において、脂肪組織、骨髄細胞または臍帯血由来細胞から得られる心筋細胞および心筋前駆細胞は、電子顕微鏡下、それぞれ心筋細胞および心筋前駆細胞の特徴を有し、遺伝子やタンパクの発現も心筋細胞および心筋前駆細胞と一致する。したがってこれら心筋前駆細胞または心筋細胞を心筋梗塞のモデルラットに移植すると、移植された宿主の中で、宿主の心筋細胞と同調して機能する心筋細胞として組み込まれる。特に、材料となる脂肪組織や骨髄細胞、臍帯血由来細胞として、移植すべき哺乳動物個体のものを用いれば、当該哺乳動物において拒絶反応を起こすことなく移植可能な心筋前駆細胞や心筋細胞を得ることができる。すなわち、本発明の方法で得られる心筋前駆細胞および心筋細胞は、心再生に好適に利用することができる。

30 現在、心筋梗塞に対する虚血領域への血管再生医療は大量の骨髄液から

得られた血管幹細胞の局所への移植により行なわれている。骨髓液採取は全身麻酔下で行なわれ、高齢者においては、その手技自体にリスクがかかる行為である。脂肪組織の採取は皮膚の単純な局所麻酔で可能であり、生命を脅かすリスクは極めて稀である。しかも材料として豊富に存在する。

- 5 したがって、本発明による心再生は医療業界に対する多大な貢献をもたらす。

4. 2 スクリーニング系への応用

- 本発明において、脂肪組織、骨髓細胞、臍帯血由来細胞から得られる心筋細胞および心筋前駆細胞は、電子顕微鏡下、それぞれ心筋細胞および心筋前駆細胞の特徴を有し、遺伝子やタンパクの発現も心筋細胞および心筋前駆細胞と一致する。したがって、これら心筋前駆細胞および／または心筋細胞に被験物質を添加して培養し、生じる表現上の変化（形態やタンパク発現の変化）あるいは遺伝的变化（遺伝子発現の変化）を、非添加の場合と比較することにより、心筋細胞の当該被験物質に対する感受性や、当該被験物質の心筋細胞に対する効果を評価することができる。この評価系は薬剤感受性試験や、心疾患治療薬のスクリーニングに利用することができる。

実施例

20 実施例 1：脂肪組織からの心筋細胞の分化

- マウスおよびラットの頸部あるいは腹部の脂肪組織約 1.5ml を眼科手術用ハサミで細切し、37℃、15分、1ml のディスパーゼ液に浸透して、細胞をほぐす。ついで、細胞を40ミクロンのナイロンメッシュに通し、 $1 \times 10^6/\text{ml}$ の濃度で播種し、DMEM+10%FCS の培地を用いて、5%CO₂、37℃にて 24 well culture dish (直径約 1.3cm) 上で2次元培養を行なう。

- マウス脂肪細胞の培養結果を図1に示す。3日後より、ビーティングする心筋細胞様の細胞が発現し、同時に球形の心筋前駆／幹細胞様細胞の増殖開始が認められた。心筋細胞は、実体顕微鏡下、ミトコンドリアに富み、ANP 顆粒を含有し、Z 帯を有し、倒立顕微鏡下、ビーティングする紡錘形をした細胞という形態的特徴から識別することができる。培養開始から約 1

週間後には紡錘形の細胞が出現し、2～3週間後にはシート構造が観察された。培養1週間目で1 well あたり 200～300 くらいの心筋細胞と思われるコロニー（集団）を形成された。

5 実施例 2：免疫染色

実施例 1 で得られた細胞が心筋細胞の特徴を備えていることを確認するために、蛍光ラベルした anti-sarcomeric actin (α -Sarcomeric Muscular Actin (Sr-1)) 抗体 (DAKO 製) および anti-cardiac actin (MBL 製) を用いた免疫染色を行った。なお、sarcomeric actin および cardiac actin は、
10 いずれも心筋細胞に特徴的な発現が認められているタンパクである。

免疫染色は、実施例 1 と同様の方法でマウス脂肪組織細胞を 14 日間培養した後、 $1\mu\text{g/ml}$ の抗体を添加することにより行った。結果を図 2 に示す。図 2 から明らかなように、培養後の細胞は緑色で蛍光ラベルされ、sarcomeric actin および cardiac actin 陽性であることが確認された。

15 脂肪組織を実施例 1 と同様に分散させ、Lin 抗体 (CD4, CD8, Gr-1, Mac-1, TER119 抗体を混和したもの；成熟した血液細胞を認識できる組み合わせ。いずれも Pharmingen 製) と、c-Kit 抗体 (Pharmingen 製) あるいは $\beta 1$ インテグリン抗体 (Pharmingen 製) で染色し、フローサイトメトリー法により自動蛍光細胞回収装置 (Epics Artra; Coulter 製) を用いて細胞を分画回
20 収し、得られた細胞各々 10^4 個ずつを 10% 牛血清を含む DMEM 培養液に混和し、24 穴の培養皿に実施例 1 と同様に培養した。その結果、Lin 陰性 c-Kit 陰性～弱陽性、あるいは Lin 陰性 $\beta 1$ インテグリン陽性細胞 (図 3 に示す細胞集団) から効率良く実施例 1 と同様の sarcomeric actin 陽性の心筋細胞が発生することが確認された (図 3)

25

実施例 3：遺伝子発現解析

実施例 1 で得られた細胞が心筋細胞であることを確認するために、RT-PCR による遺伝子発現解析を行った。まず、実施例 1 と同様の方法でマウス脂肪組織細胞を 14 日間培養した後、RNeasy Mini Kit (Qiagen 製) を
30 用いて Total RNA を抽出し、PCR Kit (Clontech 製) を用いて cDNA に逆転

写した。次いで、Advantage polymerase Mix (Clontech 製) を利用し、以下に示す α 、 β -MHC、 α -skeletal A、 α -cardiac A、MLC-2a, 2v、BNP 検出用 PCR プライマーによる RT-PCR を行った。

- α -MHC-S 5'-tgt ctg ctc tcc acc ggg aaa atc t-3' (配列番号 1)
- 5 α -MHC-AS 5'-cat ggc caa ttc ttg act ccc atg a-3' (配列番号 2)
- β -MHC-S 5'-aac cca ccc aag ttc gac aag atc g-3' (配列番号 3)
- β -MHC-AS 5'-cca act ttc ctg ttg ccc caa aat g-3' (配列番号 4)
- α -skeletal A-S 5'-gga gat tgt gcg cga cat caa aga g-3' (配列番号 5)
- α -skeletal A-AS 5'-tgg tga tcc aca tct gct gga agg t-3' (配列番号 6)
- 10 α -cardiac A-S 5'-gac cac cgc ttt ggt gtg tga caa t-3' (配列番号 7)
- α -cardiac A-AS 5'-gcc aga atc cag aac aat gcc tgt g-3' (配列番号 8)
- MLC-2a-S 5'-agc agg cac aac gtg gct ctt cta a-3' (配列番号 9)
- MLC-2a-AS 5'-cct ggg tca tga gaa gct gct tga a-3' (配列番号 10)
- 15 MLC-2v-S 5'-atg gca cct ttg ttt gcc aag aag c-3' (配列番号 11)
- MLC-2v-AS 5'-ccc tcg gga tca aac acc ttg aat g-3' (配列番号 12)
- BNP-S 5' -aaa agt cgg agg aaa tgg ccc aga g-3' (配列番号 13)
- BNP-AS 5' -tgc ctg agg gga aat gct cag aac t-3' (配列番号 14)
- (S:sense primer、AS:anti-sense primer)

- 20 結果を図 4 に示す。図中各ラインは、1 : 採取したばかりの脂肪組織、2 : 培養後の細胞、3、マウスの心臓由来心筋細胞、4 : 水を示す。図 4 から明らかなように、培養後の細胞では、心筋細胞特異的な α 、 β -MHC、 α -skeletal A、 α -cardiac A、MLC-2v、BNP の発現が認められた。

25 実施例 4 : 核内転写因子の解析

次に、心筋細胞特異的な核内転写因子 GATA-4、および NKX2.5 遺伝子の発現解析を行った。解析は、実施例 3 にしたがって cDNA を取得し、以下に示す GATA-4、および NKX2.5 検出用 PCR プライマーを用いた RT-PCR により行った。

- 30 Nkx2.5-S 5'-tct ggt tcc aga acc gtc gct aca a-3' (配列番号 15)

Nkx2.5-AS 5'-atc gcc ctt ctc cta aag gtg gga gt-3' (配列番号 16)

GATA4-S 5'-gag tgt gtc aat tgt ggg gcc atg t-3' (配列番号 17)

GATA4-AS 5'-tgc tgc tag tgg cat tgc tgg agt t-3' (配列番号 18)

(S:sense primer、AS:anti-sense primer)

- 5 結果を図 5 に示す。図中各ラインは、1：採取したばかりの脂肪組織、
2：培養後の細胞、3、マウスの心臓由来心筋細胞、4：水を示す。図 5
から明らかなように、培養後の細胞では、心筋細胞特異的転写因子 GATA-4、
および NKX2.5 遺伝子の発現が確認された。

10 実施例 5：培養条件の最適化（脂肪組織からの心筋細胞分化）

- DMEM+10%FCS の培養液に、それぞれ LIF (leukemia inhibitory factor)
2000U/ml HB-EGF 0.5 μ g/ml、LIF2000U/ml+HB-EGF0.5 μ g/ml を添加し、
実施例 1 と同様にして培養を行った。培養後の細胞を α -sarcomeric actin
および cardiac actin に対する抗体を用いて実施例 2 と同様の方法で免疫
15 染色し、その蛍光強度から心筋細胞の発現数を蛍光顕微鏡 (1x70, Olympus)
を用いて未添加の場合と比較評価した (各々 4 サンプル)。

- その結果、LIF 単独では心筋細胞の分化は促進傾向にはあったが、添加
しない場合と比較して有意差は認められなかった。一方、HB-EGF 単独では、
添加しない場合と比較して $p < 0.05$ の有意差で心筋細胞の分化が促進され
20 た。さらに、LIF+HB-EGF では、 $p < 0.05$ の有意差で、最も心筋細胞の分化
が促進された。

実施例 6：心筋梗塞モデルラットへの移植実験

- 雄性 SD ラット (N=19) は動脈結紮により心筋梗塞を誘導し、心筋梗塞モ
25 デルラットを作製した。実施例 1 にしたがってラット脂肪組織由来の細胞を
単離し、10%FCS を含む DMEM 培養液にて培養して脂肪組織由来心筋細胞を
得た。得られた脂肪組織由来心筋細胞 (2×10^6 個/ml 濃度の細胞を 0.1ml ず
つ 5 ケ所) を心筋梗塞モデルラット (N=9) の心筋梗塞巣に注入し、試験群
とした。また、比較群および対象群として、それぞれ PBS を注入した心筋
30 梗塞モデルラット (N=10)、および梗塞処置を施していないシャムオペレ

ーションラット (N=6) を用意した。それぞれの群について、注入 28 日後の心機能の改善を心超音波検査にて解析し、

その結果、PBS を注入した比較群では正常ラットの約 1 / 5 まで心機能の低下が認められたが、脂肪組織由来心筋細胞を注入した試験群では、正常ラットの約 4 / 5 までしか心機能の低下は認められなかった。

実施例 7 : 脂肪組織由来細胞と骨髄由来細胞の共培養

実施例 1 にしたがって単離したマウス脂肪組織の細胞 1×10^6 個を PKH67 Green Fluorescent cell Linker Kit (SIGMA 製) で蛍光標識した骨髄細胞 1×10^5 個/ml と混合し、DMEM+10%FCS の培養液 1ml 中に混和し、24 well culture dish (直径約 1.3cm) 上で培養した。比較として、PKH67 で蛍光標識した骨髄細胞を同様の条件で単独培養した。

結果を図 6 に示す。心筋組織の細胞と共培養を行った骨髄細胞では、培養開始後 1 ~ 2 週間の間に 20 ~ 60 コロニーくらいの心筋細胞と思われるコロニーが生成した。この心筋細胞コロニーには PKH67 で蛍光標識された骨髄由来の細胞が含まれていた (図 6 A)。一方、単独培養した骨髄細胞では、心筋細胞への分化は認められなかった (図 6 B)。

実施例 8 : 共培養条件の最適化

1×10^6 脂肪組織の細胞に対して、共培養する骨髄由来の細胞数を 5×10^4 、 1×10^5 、 2.5×10^5 、 5×10^5 、 1×10^6 と変化させ、その影響を検討した。結果を図 7 に示す。図 7 から明らかなように、 2.5×10^5 個の骨髄細胞を混合した場合、つまり、脂肪組織 : 骨髄細胞 = 4 : 1 の割合で共培養した場合に、最も多くの PKH67 で蛍光標識された骨髄細胞由来心筋細胞が得られることがわかった。

実施例 9 : 骨髄細胞の分化に影響を与える因子

次に、骨髄細胞の分化に影響を与える因子を検討するために、脂肪組織の細胞と骨髄細胞を 0.4 ミクロンのポアを有する膜 (Cell culture insert:FALCON 製) で隔てて、実施例 8 と同様に培養を行った。その結果、

細胞間の接着が抑制され、液性成分のみが作用し合う条件下においても、骨髄細胞の心筋細胞への分化が認められることが確認された。このことは、脂肪組織の心筋細胞への分化培養系から得られる培養上清中に、骨髄細胞を心筋細胞に分化誘導する液性分子が含まれていることを意味する。

5

実施例 10：ヒト脂肪組織からの心筋細胞の分化

ヒトの心臓、大動脈周囲および大網部に存在する脂肪組織から細胞を単離し、37℃、30分、5ml のディスパーゼ液に浸透して細胞をほぐした後、細胞を40ミクロンのナイロンメッシュに通した。この細胞 $1 \times 10^6/\text{ml}$ を
10 DMEM+10%FCS の培地に播種し、5%CO₂、37℃にて24 well culture dish(直径約1.3cm)上で2次元培養を行った。

培養2週間後の細胞をanti-sarcomeric actin(SA)抗体を用いた免疫染色を行った。ネガティブコントロールとして二次抗体である抗-マウス免疫グロブリンのみを用いて同様に染色を行った。その結果、ヒト脂肪組織からSA
15 陽性の心筋細胞の誘導が確認された(図8(A)上)。

さらに、PDGF-AB(Invitrogen製)10ng/mlを添加して同様に2週間培養を行い、蛍光顕微鏡下(x20)ランダムな5視野における全接着細胞数に対するSA陽性細胞数を求め、非添加の場合と比較した(図8(C))。その結果、PDGF-ABを非添加の場合には、全接着細胞のうち約1%がSA陽性であるの
20 に対し、PDGF-ABを添加した場合にはその約2倍のSA陽性心筋細胞が出現していることが確認された。

実施例 11：マウス脂肪組織とヒト臍帯血の共培養法による、臍帯血の心筋細胞への分化

25 ヒト臍帯血(CB)からFicoll-Paque Plusを用いて、単核球分画のみを分離した。実施例1にしたがい、マウスの脂肪組織から細胞を分離した。図9(A)に示すように、ヒト臍帯血由来単核球細胞(hCBMNC) $1 \times 10^6/\text{ml}$ とマウス脂肪組織由来細胞(BATDC) $2 \times 10^5/\text{ml}$ を、0.4ミクロンのポアを有する膜(Cell culture insert:FALCON製)で隔てて、分離共培養を行った。培養条件は、
30 DMEM+10%FCSの培地を用い、5%CO₂、37℃で2次元培養を行った。対照とし

て、hCBMNC 1×10^6 /mlのみを同様の条件で24 well culture dishを用いて培養した。

- 培養2週間後の細胞をanti-sarcomeric actin (SA) 抗体を用いた免疫染色を行った。その結果、hCBMNCからSA陽性の心筋細胞の誘導が確認されたが(図 9 (B) 右)、hCBMNCのみを培養した場合には心筋細胞の誘導は認められなかった(図 9 (B) 左)。さらに、蛍光顕微鏡下 (x 20) ランダムな5視野における全接着細胞数に対するSA陽性細胞数を求めたところ、共培養では全接着細胞のうち約1%がSA陽性の心筋細胞であることが確認された。

- 10 本明細書中で引用した全ての刊行物、特許および特許出願をそのまま参考として本明細書中にとり入れるものとする。

産業上の利用の可能性

- 本発明で得られる心筋細胞および心筋前駆細胞は、表現的形質にも遺伝的形質も心筋細胞と一致する。したがって、これら細胞は、心臓領域の再生医療に好適に利用することができる。また心筋細胞の薬剤感受性評価や心疾患治療薬のスクリーニング系等に利用できる。

配列表フリーテキスト

- 20 配列番号 1 – 人工配列の説明：プライマー (α -MHC-S)
 配列番号 2 – 人工配列の説明：プライマー (α -MHC-AS)
 配列番号 3 – 人工配列の説明：プライマー (β -MHC-S)
 配列番号 4 – 人工配列の説明：プライマー (β -MHC-AS)
 配列番号 5 – 人工配列の説明：プライマー (α -skeletal A-S)
 25 配列番号 6 – 人工配列の説明：プライマー (α -skeletal A-AS)
 配列番号 7 – 人工配列の説明：プライマー (α -cardiac A-S)
 配列番号 8 – 人工配列の説明：プライマー (α -cardiac A-AS)
 配列番号 9 – 人工配列の説明：プライマー (MLC-2a-S)
 配列番号 10 – 人工配列の説明：プライマー (MLC-2a-AS)
 30 配列番号 11 – 人工配列の説明：プライマー (MLC-2v-S)

- 配列番号 1 2 – 人工配列の説明：プライマー (MLC-2v-AS)
- 配列番号 1 3 – 人工配列の説明：プライマー (BNP-S)
- 配列番号 1 4 – 人工配列の説明：プライマー (BNP-AS)
- 配列番号 1 5 – 人工配列の説明：プライマー (Nkx2. 5-S)
- 5 配列番号 1 6 – 人工配列の説明：プライマー (Nkx2. 5-AS)
- 配列番号 1 7 – 人工配列の説明：プライマー (GATA4-S)
- 配列番号 1 8 – 人工配列の説明：プライマー (GATA4-AS)

請 求 の 範 囲

1. 哺乳動物の骨髓細胞または臍帯血由来細胞を、哺乳動物の脂肪組織から単離された細胞またはその培養上清とともに培養することにより、
5 該骨髓細胞または臍帯血由来細胞を心筋前駆細胞および／または心筋細胞に分化させる方法。
2. 牛血清またはヒト血清、もしくはこれらの代替物を含む培養液を用いて少なくとも1日間以上培養することを特徴とする、請求項1に記載の方法。
- 10 3. 少なくとも1種類以上のサイトカインを培養液中に添加して培養を行うことを特徴とする、請求項1または2に記載の方法。
4. サイトカインが、EGF、TGF- α 、HB-EGF、FGF、および HGF を含む EGF ファミリー、TGF- β を含む TGF- β ファミリー、LIF を含む IL ファミリー、VEGF-A を含む VEGF ファミリー、PDGF-AB および PDGF-BB を含む
15 PDGF ファミリー、エフリン B を含むエフリンファミリー、および SCF から選ばれる、請求項3記載の方法。
5. 骨髓細胞が間葉系幹細胞あるいは造血幹細胞である、請求項1～4のいずれか1項に記載の方法。
6. 臍帯血由来細胞が単核球である、請求項1～5のいずれか1項に記載
20 の方法。
7. 骨髓細胞または臍帯血由来細胞と脂肪組織から単離された細胞との混合比率が0.1 : 1 ~ 1 : 10である、請求項1～6のいずれか1項に記載の方法。
8. 得られる心筋前駆細胞および／または心筋細胞が、sarcomeric actin
25 陽性である、請求項1～7のいずれか1項に記載の方法。
9. 請求項1～8のいずれか1項に記載の方法で作製される心筋前駆細胞および／または心筋細胞。
10. 哺乳動物成体に移植可能なことを特徴とする、請求項9に記載の心筋前駆細胞および／または心筋細胞。
- 30 11. 請求項9または10に記載の心筋前駆細胞および／または心筋細胞

に被験物質を添加することにより、心筋前駆細胞および／または心筋細胞に対する該被験物質の効果を評価する方法。

図 1

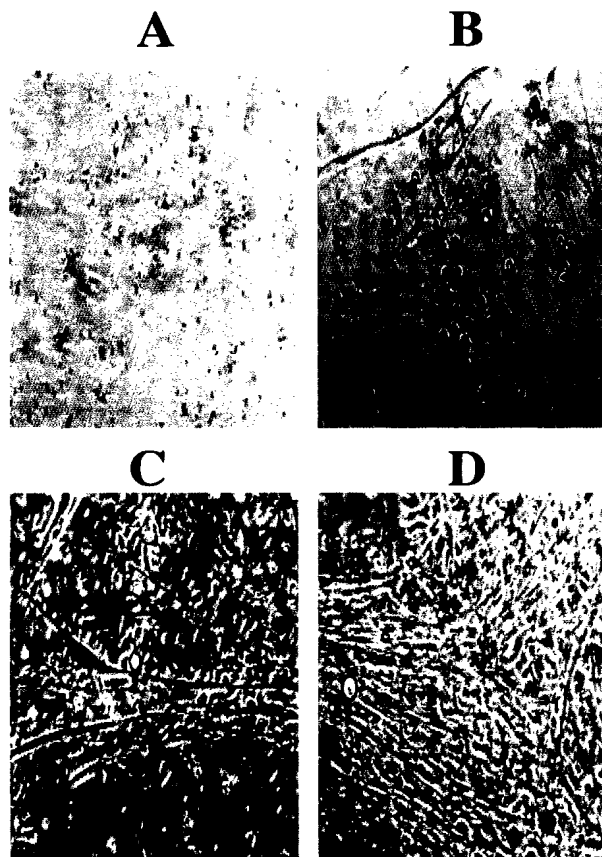
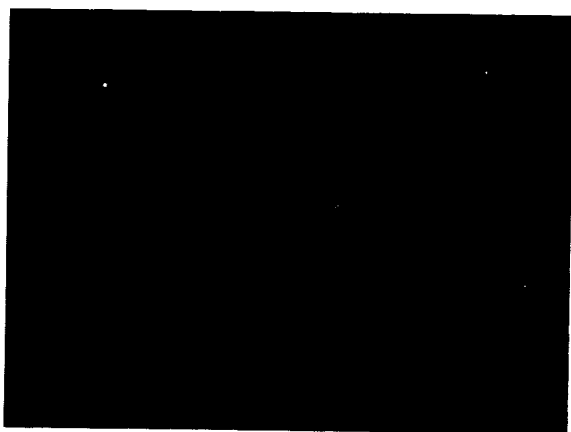


図 2

A.



B.

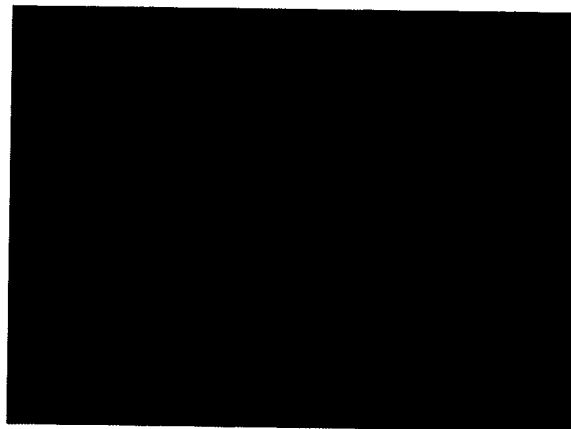


図 3

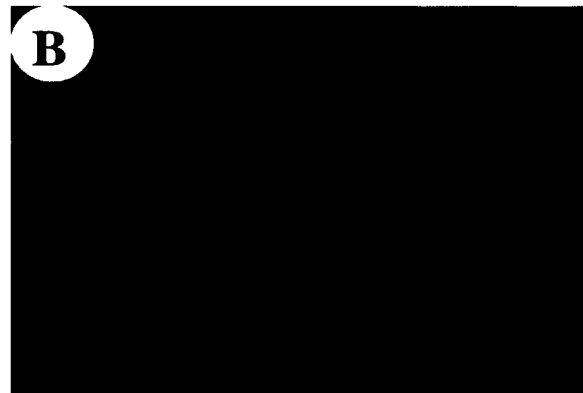
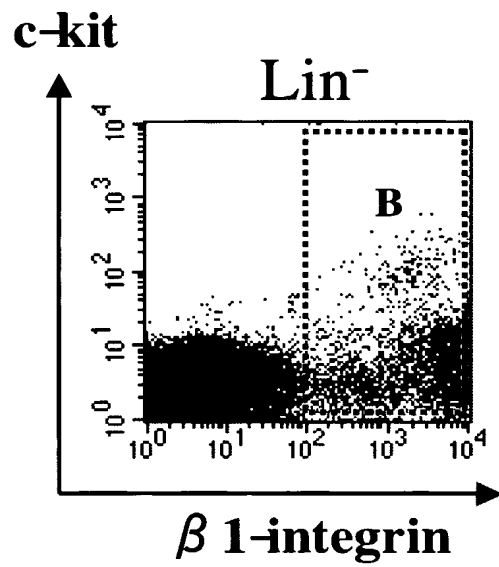
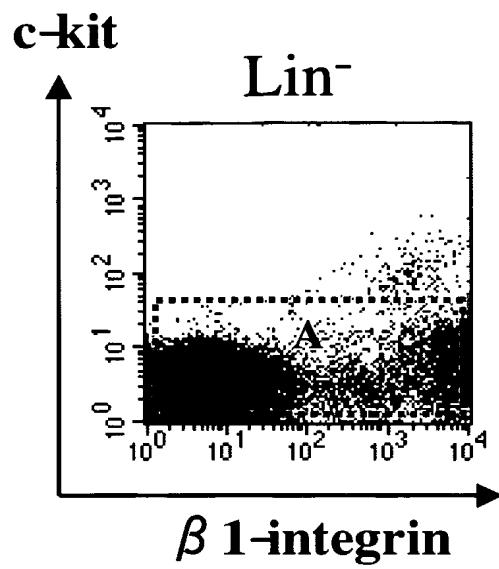


図 4

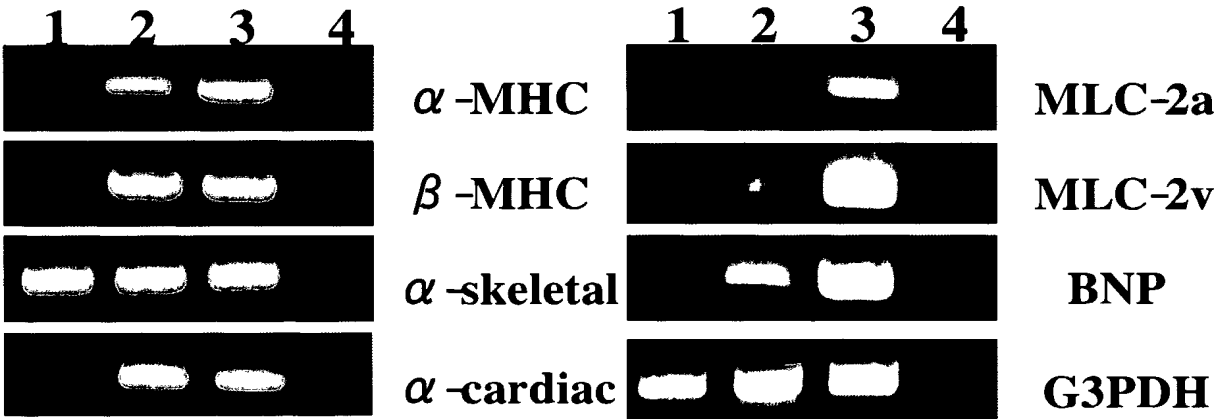


図 5

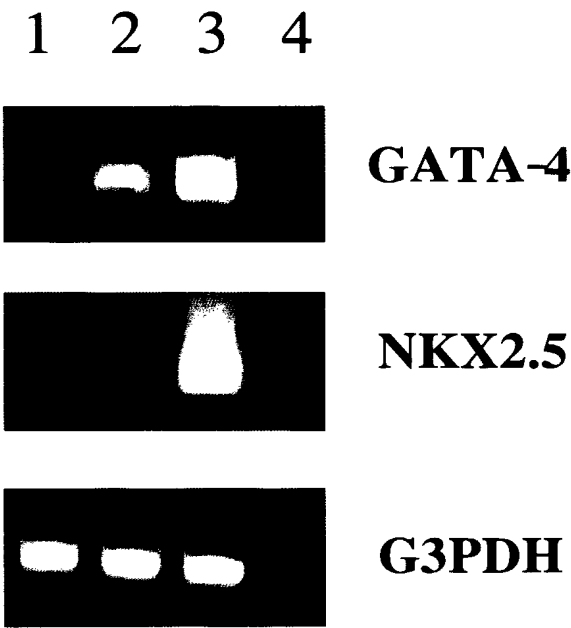


図 6

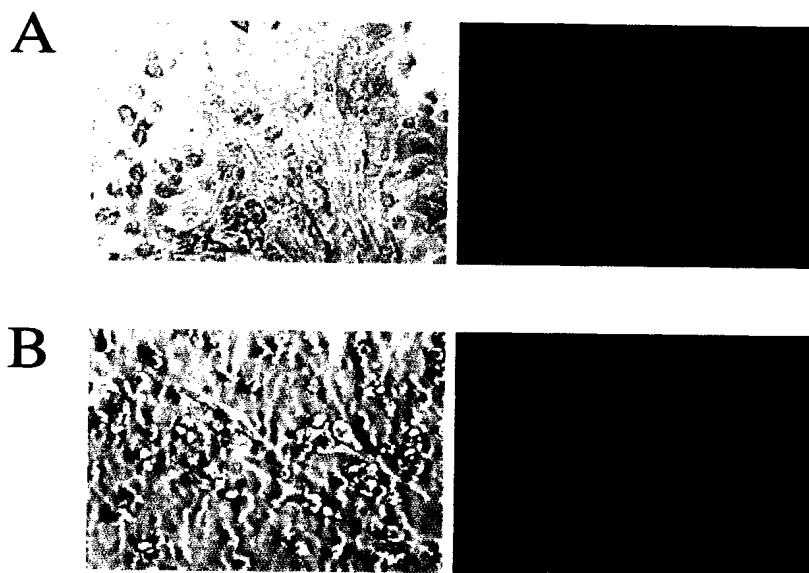
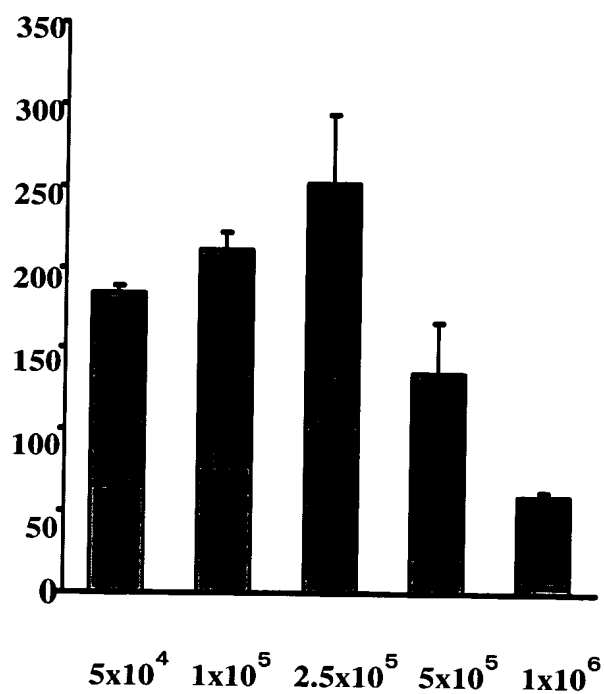
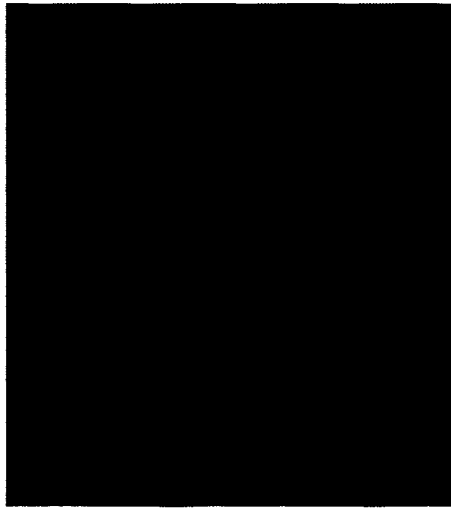
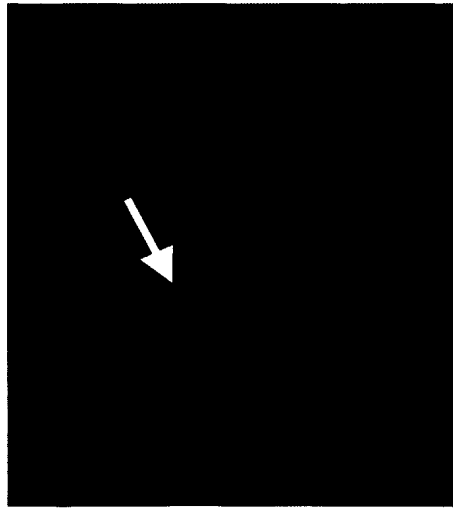


図 7



8

A



B

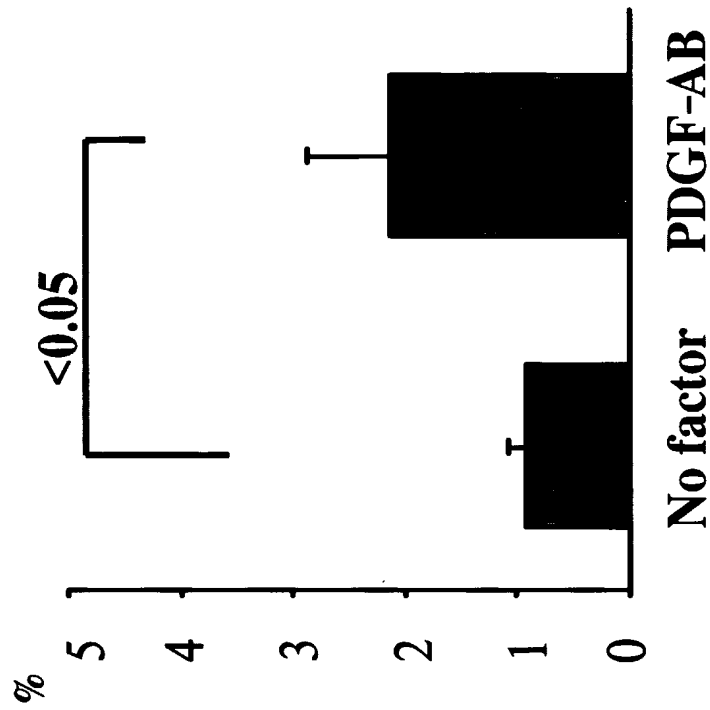
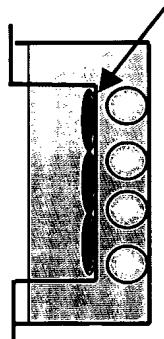
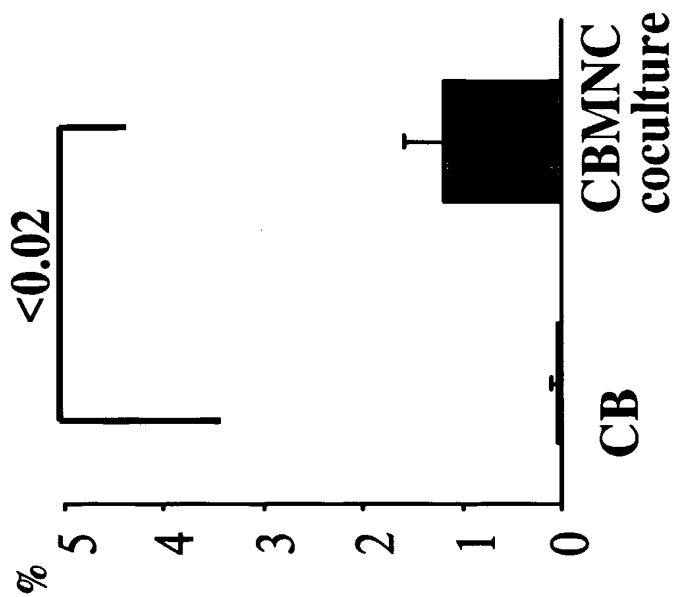


図9

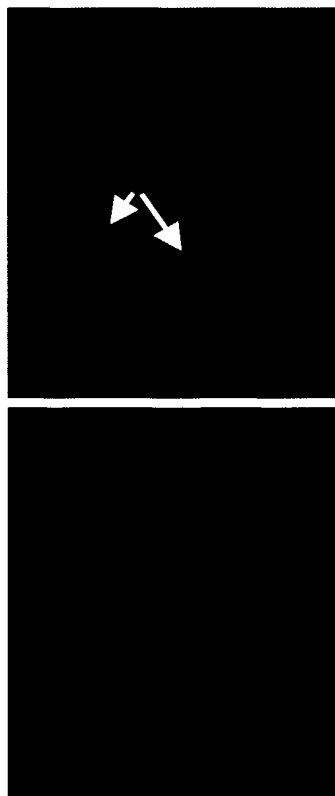
A



C



B



SEQUENCE LISTING

<110> Kanazawa University Technology Licensing Organization LTD.
Japan Science and Technology Agency

<120> Induction of cardiomyocyte by using mammalian bone marrow cell or cord blood-derived cell and adipose tissue

<130> PH-2354PCT

<140>

<141>

<150> JP2003-429088

<151> 2003-12-25

<160> 18

<170> PatentIn Ver. 2.1

<210> 1

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Inventor: Takakura, Nobuyuki; Yamada, Yoshihiro

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:primer (alpha-MHC-S)

<400> 1

tgtctgctct ccaccgggaa aatct

25

<210> 2

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:primer (alpha-MHC-AS)

<400> 2

catggccaat tcttgactcc catga

25

<210> 3
<211> 25
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence:primer (beta-MHC-S)

<400> 3
aaccaccca agtcgacaa gatcg 25

<210> 4
<211> 25
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence:primer (beta-MHC-AS)

<400> 4
ccaactttcc tgttgcccca aaatg 25

<210> 5
<211> 25
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence:primer (alpha-skeletal A-S)

<400> 5
ggagattgtg cgcgacatca aagag 25

<210> 6
<211> 25
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence:primer (alpha-skeletal A-AS)

<400> 6

tggatgaccca catctgctgg aaggt

25

<210> 7

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:primer (alpha-cardiac A-S)

<400> 7

gaccaccgct ttggtgtgtg acaat

25

<210> 8

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:primer (alpha-cardiac A-AS)

<400> 8

gccagaatcc agaacaatgc ctgtg

25

<210> 9

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:primer (MLC-2a-S)

<400> 9

agcaggcaca acgtggctct tctaa

25

<210> 10

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:primer (MLC-2a-AS)

<400> 10

cctgggtcat gagaagctgc ttgaa

25

<210> 11

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:primer (MLC-2v-S)

<400> 11

atggcacctt tgtttgccaa gaagc

25

<210> 12

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:primer (MLC-2v-AS)

<400> 12

ccctcgggat caaacacctt gaatg

25

<210> 13

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:primer (BNP-S)

<400> 13

aaaagtcgga ggaaatggcc cagag

25

<210> 14

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:primer (BNP-AS)

<400> 14

tgccctgaggg gaaatgctca gaact

25

<210> 15

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:primer (Nkx2.5-S)

<400> 15

tctggttcca gaaccgtcgc tacaa

25

<210> 16

<211> 26

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:primer (Nkx2.5-AS)

<400> 16

atgcccttc tcctaaaggt gggagt

26

<210> 17

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:primer (GATA4-S)

<400> 17

gagtgtgtca attgtggggc catgt

25

<210> 18

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:primer (GATA4-AS)

<400> 18

tgctgctagt ggcattgctg gagtt

25

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2004/019666

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl⁷ C12N5/06, A61L27/00, C12Q1/02

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl⁷ C12N5/06, A61L27/00, C12Q1/02

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

WPI (DIALOG), BIOSIS (DIALOG), JSTPlus (JOIS), MEDLINE (STN)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 01/48150 A1 (Kyowa Hakko Kogyo Co., Ltd.), 05 July, 2001 (05.07.01), & AU 200110552 A & US 2002/0142457 A1	1-11
X	WO 01/48151 A1 (Kyowa Hakko Kogyo Co., Ltd.), 05 July, 2001 (05.07.01), & AU 200122281 A & EP 1254952 A1	1-11

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C.

☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search
05 April, 2005 (05.04.05)

Date of mailing of the international search report
26 April, 2005 (26.04.05)

Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC)) Int. Cl ⁷ C12N5/06、A61L27/00、C12Q1/02		
B. 調査を行った分野 調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC)) Int. Cl ⁷ C12N5/06、A61L27/00、C12Q1/02		
最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの		
国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語) WPI (DIALOG)、BIOSIS (DIALOG)、JSTPlus (JOIS)、MEDLINE (STN)		
C. 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
X	WO 01/48150 A1 (協和醗酵工業株式会社) 2001. 07. 05 & AU 200110552 A & US 2002/0142457 A1	1-11
X	WO 01/48151 A1 (協和醗酵工業株式会社) 2001. 07. 05 & AU 200122281 A & EP 1254952 A1	1-11
<input type="checkbox"/> C欄の続きにも文献が列挙されている。 <input type="checkbox"/> パテントファミリーに関する別紙を参照。		
* 引用文献のカテゴリー 「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの 「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの 「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す) 「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献 「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願日の後に公表された文献 「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの 「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの 「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの 「&」 同一パテントファミリー文献		
国際調査を完了した日 05. 04. 2005	国際調査報告の発送日 26. 04. 2005	
国際調査機関の名称及びあて先 日本国特許庁 (ISA/J P) 郵便番号 100-8915 東京都千代田区霞が関三丁目4番3号	特許庁審査官 (権限のある職員) 田村 明 照	4 B 8 4 1 2
電話番号 03-3581-1101 内線 3448		